

**Results.** In ordinary pumpkin sheet found 4 hydroxycinnamic acid was the dominant component of chlorogenic acid (0.09 %), the rest were found in minor amounts. Found flavone apigenin aglycones (0.01 %) and Luteolin (0.004 %), and quercetin glycosides: isoquercitrin (0.08 %) and rutin (0.23 %).

**Conclusions.** Studied by HPLC qualitative and quantitative composition of the phenolic content of a number of nature leaves ordinary pumpkin varieties " Ukrainian prolific" harvested in the Kharkiv region.

**Key words:** plain pumpkin, leaves, phenolic compounds, HPLC.

**Відомості про авторів:**

**Батюченко Іванна Іванівна** - здобувач кафедри хімії природних сполук НФаУ.

**Федченкова Юлія Анатоліївна** - к. фарм. н., докторант кафедри ХПС НФаУ.

**Хворост Ольга Павлівна** - д. фарм. наук, професор кафедри ХПС НФаУ. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53, науковий відділ.

УДК 615.31;615.32

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

*Н.А. Бісько, Н.О. Козіко, І.В. Саханда*

## ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ АЗОТНОГО І ВУГЛЕЦЕВОГО ЖИВЛЕННЯ НА РІСТ ТА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *HERICIUM ERINACEUS* (BULL.) PERS

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

**Вступ.** Пошук нових природних джерел фізіологічно активних сполук з метою отримання ефективних та безпечних препаратів є однією з важливих задач сучасної мікології та біотехнології. Серед лікарських препаратів значну увагу стали привертати лікувальні засоби, отримані біотехнологічним способом на основі грибно́ї біомаси, а у якості продуцентів частіше почали використовувати макроміцети, особливо *Basidiomycota*.

**Мета.** Вивчення впливу джерел вуглецевого та азотного живлення на ріст та антиоксидантну активність штамів *Hericium erinaceus*.

**Матеріали і методи.** В якості основного об'єкта дослідження виступили 3 штами їжовика гребінчастого з колекції культур шапинкових грибів (ІВК) відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (м. Київ). Чисті міцеліальні культури отримано з дикорослих плодів тіл, зібраних в Ізраїлі (Хайфа), Японії та Китаї.

**Результати.** Представлено результати дослідження росту, морфологічних особливостей та антиоксидантної активності цінного лікарського виду *Hericium erinaceus*. Біотехнологічне використання *H. erinaceus* як потенційного продуцента цінних речовин із різними біологічними властивостями стало можливим лише з введенням його в чисту культуру. Проте відомості щодо особливостей росту і розвитку в чистій культурі не завжди повні, а іноді суперечливі. Саме тому існує необхідність у подальшому детальному вивченні основних морфологічних і культуральних ознак *H. erinaceus* при вирощуванні за різних умов культивування. Для всіх досліджених культур найсприятливішими для росту виявилась температура інкубації – 26°C, критичною була температура 36°C. рН у межах 6,0-6,5.

**Висновки.** Встановлено, що джерела азотного та вуглецевого живлення впливають на ріст та антиоксидантну активність штамів. Виявлено, що найбільшу кількість біомаси накопичують штами 991 та 965 при культивуванні з додаванням джерела вуглецю - глюкози, а штам 1606 – джерела азоту - нітрату натрію.

**Ключові слова:** *Hericium erinaceus*, антиоксидантна активність, джерела азотного та вуглецевого живлення, ріст, культивування.

### ВСТУП

Останнім часом розширюються дослідження, пов'язані з вивченням оксидативного стресу у різноманітних груп живих організмів. В усьому світі проводиться пошук джерел антиоксидантів – сполук, які гальмують розвиток патологічних процесів, котрі індукуються активними формами кисню. Останні, як відомо, є основною причиною оксидативного стресу. Оскільки біологічно активні речовини (БАР) природного походження мають низку переваг порівняно з їх синтетичними аналогами, увага дослідників в основному спрямована на вивчення природних джерел речовин з антиоксидантною активністю [1].

В зв'язку з розвитком грибних біотехнологій, зростає інтерес до БАР, синтезованих вищими базидіальними грибами. Однією з переваг культивування грибів є їх здатність добре й швидко рости на штучних та некоштовних середовищах. Значний інтерес викликають дослідження антиоксидантної активності грибних меланінових пігментів. Встановлено, що ці фенольні сполуки мають генотоксичні властивості та швидко взаємодіють з вільними радикалами, які містять неспарений електрон в своїй структурі [2]. Також створено комбінований грибний препарат на основі біологічно активних речовин *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst та *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom [3].

Одним з широко культивованих їстівних лікарських грибів є їжовик гребінчастий – *Hericium erinaceus* – одне з перспективних джерел цінних поживних та біологічно активних речовин, таких як амінокислоти, вітаміни, лектини, жирні кислоти, різноманітні вторинні метаболіти. Для штамів даного виду відмічена висока антиоксидантна активність, що дозволяє віднести їх до перспективних продуцентів біоантиоксидантів [4].

В процесах росту і розвитку культур *in vitro* важливе значення мають джерела азотного та вуглецевого живлення. Для вищих базидіальних грибів основну роль в метаболізмі відіграють сполуки, які містять вуглець, оскільки вони виконують дві основні функції: беруть участь в процесах окислення, де є єдиним джерелом енергії та забезпечують вуглецем, який є необхідним для синтезу речовин живої клітини.

Азотисті сполуки – основа білків – важливішою складовою частини протоплазми. На відміну від деяких бактерій вищі базидіоміцети не здатні зв'язувати атмосферний азот. Вони можуть використовувати його лише у формі неорганічних солей або органічних азотних сполук. Найрозповсюдженішими неорганічними джерелами азоту для базидіальних грибів є нітрати амонію [5].

Враховуючи вище зазначене, **метою роботи** було вивчення впливу джерел вуглецевого та азотного живлення на ріст та антиоксидантну активність штамів *Hericium erinaceus*.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були 3 штами їжовика гребінчастого з колекції культур шапинкових грибів відділу мікології Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (м. Київ). Чисті міцеліальні культури отримано з дикорослих плодівих тіл, зібраних в Ізраїлі (Хайфа), Японії та Китаї.

Метод, що використовувався для визначення антиоксидантної активності, заснований на вивченні кінетики окислення відновленої форми 2,6-дихлорфеноліндифенолу киснем повітря в присутності та відсутності біологічного матеріалу та розрахунку величини константи інгібування

біологічним матеріалом окислення 2,6-дихлорфеноліндофенолу як показника антиоксидантної активності [6].

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Проведене раніше вивчення динаміки антиоксидантної активності даних штамів *Hericium erinaceus* показало, що максимального значення показник активності досягає на 12 добу культивування при температурі 26°C. Встановлено також, що антиоксидантна активність культуральної рідини була вище, ніж міцеліальної біомаси [6].

Штами вирощували стаціонарно в колбах Ерленмейера об'ємом 50 мл при температурі 26°C протягом 12 діб. Як джерело вуглецевого живлення використовували наступні вуглеводи: глюкоза, сахароза, лактоза, крохмаль. Дані речовини було додано в середовище в концентраціях, еквівалентних кількості глюкози в глюкозо-аспарагіновому середовищі. Як джерело азотного живлення було використано сульфат амонію та нітрат натрію в концентраціях, еквівалентних кількості аспарагіну у вище названому середовищі.

Дані з накопичення біомаси штамми залежно від джерела азоту та вуглецю в середовищі представлені в таблиці.

*Таблиця*

**Вплив джерел азотного та вуглецевого живлення на накопичення біомаси штамми *Hericium erinaceus* (26 °C)**

Джерело живлення	Накопичення біомаси, x 10 <sup>-3</sup> г/л		
	991	965	1606
Лактоза	9,75±0.02	10,5±0.01	15,3±0.01
Сахароза	11,3±0.01	16,2±0.03	26,0±0.04
Крохмаль	10,1±0.05	9,80±0.12	13,4±0.02
Глюкоза	13,5±0.03	19,7±0.05	28,1±0.1
Сульфат амонію	6,78±0.01	7,30±0.01	6,60±0.02
Нітрат натрію	12,0±0.02	17,9±0.11	40,6±0.15
Аспарагін	13,5±0.03	19,7±0.05	28,1±0.1

Як видно з таблиці найбільшу кількість біомаси накопичують штамми 991 та 965 при культивуванні з додаванням джерела вуглецю - глюкози, а штам 1606 – джерела азоту - нітрату натрію. Найгірше зростали всі досліджувані штамми при культивуванні з додаванням сульфату амонію.

Результати вивчення впливу джерел азоту та вуглецю на антиоксидантну активність (АОА) штамів представлені на графіках (рис. 1, 2, 3).

Аналізуючи представлені дані, можна сказати, що досліджувані штамми значно відрізняються за показником антиоксидантної активності (АОА). Так, можна відмітити, що для штам 991 (рис.1) високий рівень антиоксидантної активності зафіксовано при культивуванні на середовищах, які містили сульфат амонію (9,73 x 10<sup>-3</sup> л/мл·хв.) та нітрат натрію (5,68 x 10<sup>-3</sup> л/мл·хв.). Важливо зауважити, що дані показники перевищують активність штам 991 при культивуванні в цих самих умовах на глюкозо-пептонному

## ФАРМХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

середовищі. Схожа тенденція не спостерігалась для інших штамів. Тому можна сказати, що для даного штаму джерела органічного азоту (пептон, аспарагін) не сприяють високому рівню антиоксидантної активності. Щодо джерел вуглецю, то високому рівню активності сприяло культивування із додаванням в середовище сахарози ( $5,62 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.).

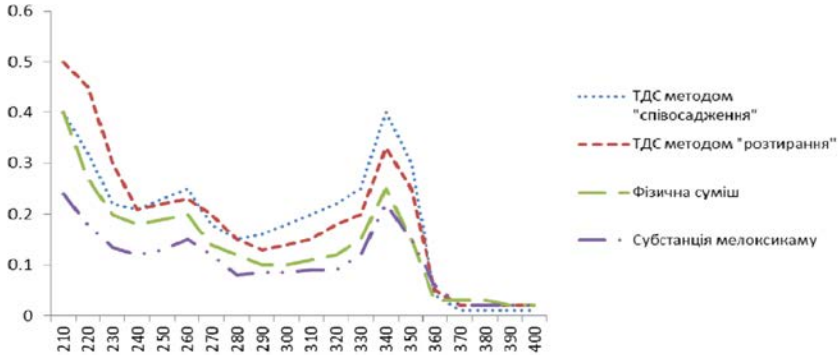


Рис. 1. Вплив джерел азоту та вуглецю на АОА штаму 991 *N. erinaceus*

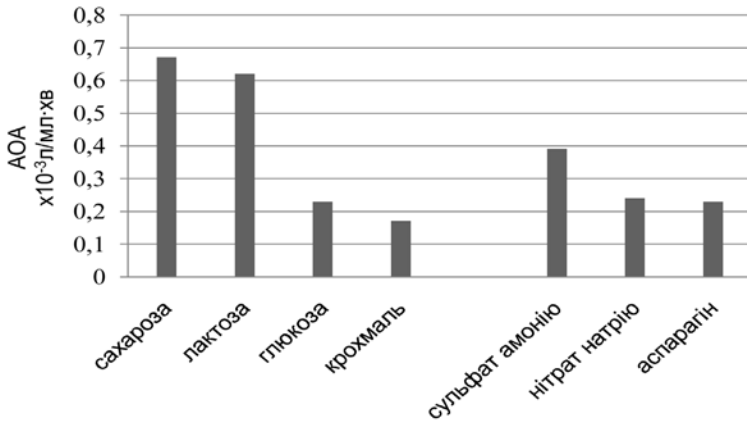


Рис. 2. Вплив джерел азоту та вуглецю на АОА штаму 965 *N. erinaceus*

Відносно штаму 965 (рис.2), найбільш високі показники активності було зафіксовано при культивуванні на середовищах, що містили лактозу ( $0,62 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) та сахарозу ( $0,67 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) – як джерело вуглецю та сульфат амонію ( $0,39 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) як джерело азоту.

Для штаму 1606 (рис.3) відмічено високий рівень антиоксидантної активності в разі використання у якості джерела азоту нітрату натрію ( $1,56 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.). Також досить високий показник при використанні таких джерел вуглецю як лактоза ( $1,54 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) та крохмаль ( $1,30 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.).

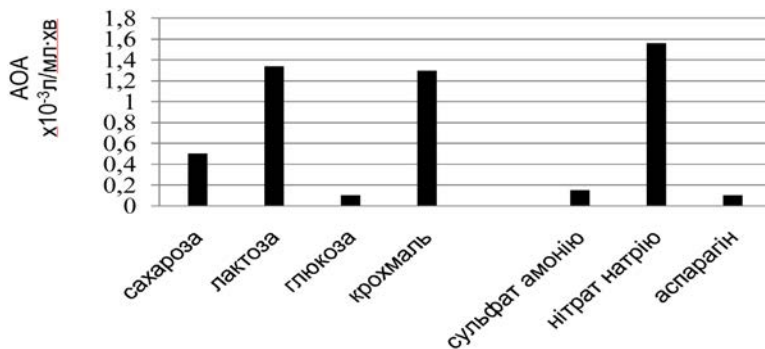


Рис. 3. Вплив джерел азоту та вуглецю на АОА штаму 1606 *H. eripaseus*

Отже, штами суттєво відрізняються за відношенням до джерел азотного та вуглецевого живлення. Це можна пояснити фенотиповою мінливістю штамів, оскільки їх було виділено з дикорослих плодів різних країн світу: Японія (991), Китай (965), Ізраїль (1606).

#### ВИСНОВКИ

Таким чином, проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Джерела азотного та вуглецевого живлення впливають на ріст та антиоксидантну активність штамів.

2. Відмічено, що найбільшу кількість біомаси накопичують штами *H. eripaseus* 991 та 965 при культивуванні з додаванням джерела вуглецю глюкози, а штам 1606 – джерела азоту нітрату натрію.

3. Показано, що для штаму 991 високий рівень антиоксидантної активності зафіксовано при культивуванні на середовищах, які містили сульфат амонію ( $9,73 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) та нітрат натрію ( $5,68 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) як джерело азоту та сахарози ( $5,62 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) як джерела вуглецю.

4. Виявлено, що для штаму 965 найбільш високі показники антиоксидантної активності спостерігаються при культивуванні на середовищах, що містили лактозу ( $0,62 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) та сахарозу ( $0,67 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) як джерело вуглецю і сульфат амонію ( $0,39 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) як джерело азоту.

5. Відмічено, що для штаму 1606 високий рівень антиоксидантної активності досягається в разі використання у якості джерела азоту нітрату натрію ( $1,56 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.), а в якості джерела вуглецю – лактозу ( $1,54 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.) та крохмаль ( $1,30 \times 10^{-3}$  л/мл·хв.).

#### Література

1. Antioxidant Properties of Fungal Melanin Pigments / Shcherba V. V., Babitskaya V. G., Kurchenko V. R. [et al.] // Applied Biochem. and Microbiol. – 2010. – Vol. 36.- №5. – P. 491-495.

2. Комбинированный грибной препарат с высокой антиоксидантной активностью / Огарков Б. Н., Теплакова Т. В., Огаркова Г. Р., Самусенко Л. В. // Успехи медицинской микологии. – 2009. – Т. 5. – С. 210-213.

3. Шелюк А. И. Перспективы использования биологически активных и питательных веществ лекарственных грибов / Шелюк А. И., Бисько Н. А. // Успехи медицинской микологии. – 2008. – Т. 5, гл 7. – С. 281-284.

4. Badalyan S. M. Antioxidant activity of culinary-medicinal mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. (Agaricomycetidae) // *Int. J. Med. Mushr.*– 2010. – Vol. 5. – P. 277-286.

5. Шиврина А. Н. Биосинтетическая деятельность высших грибов / Шиврина А. Н., Низковская О. П., Фамина Н. Н. - Л.: Наука, 2006. – 243 с.

6. Семенов В. Л. Метод определения антиоксидантной активности биологического материала / Семенов В. Л., Ярош А. М. // *Укр. биохим. журн.* – 2009. – Т. 57, № 3. – С. 50-52.

***Н.А. Бисько, Н.А. Козико, И.В. Саханда***

## **Влияние источников азотного и углеродного питания на рост и антиоксидантную активность штаммов *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers**

**Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца**

**Вступление.** Поиск новых природных источников физиологически активных соединений с целью получения эффективных и безопасных препаратов является одной из важных задач современной микологии и биотехнологии. Среди лекарственных препаратов значительное внимание стали привлекать лечебные средства, полученные биотехнологическим способом на основе грибной биомассы, а в качестве продуцентов чаще стали использовать макромицеты, особенно Basidiomycota.

**Цель.** Изучение влияния источников углеродного и азотного питания на рост и антиоксидантную активность штаммов *Hericium erinaceus*.

**Материалы и методы.** В качестве основного объекта исследования выступили 3 штамма ежевика гребенчатого из коллекции культур шляпочных грибов отдела микологии Института ботаники им. М.Г. Холодного НАН Украины (г. Киев). Чистые мицелиальные культуры получены из дикорастущих плодовых тел, собранных в Израиле (Хайфа), Японии и Китае.

**Результаты.** Представлены результаты исследования роста, морфологических особенностей и антиоксидантной активности ценного лекарственного вида *Hericium erinaceus*. Биотехнологическое использование *H. erinaceus* как потенциального продуцента ценных веществ с различными биологическими свойствами стало возможным только с введением его в чистую культуру. Однако сведения об особенностях роста и развития в чистой культуре не всегда полны, а иногда противоречивы. Именно поэтому существует необходимость в дальнейшем детальном изучении основных морфологических и культуральных признаков *H. erinaceus* при выращивании в различных условиях культивирования. Для всех исследованных культур благоприятными для роста оказалась температура инкубации – 26°C, критической была температура 36°C. рН в пределах 6,0-6,5.

**Выводы.** Установлено, что источники азотного и углеродного питания влияют на рост и антиоксидантную активность штаммов *Hericium erinaceus*. Выявлено, что наибольшее количество биомассы накапливают штаммы 991 и 965 при культивировании с добавлением источника углерода - глюкозы, а штамм 1606 – источника азота - нитрата натрия.

**Ключевые слова:** *Hericium erinaceus*, антиоксидантная активность, источники азотного и углеродного питания, рост, культивирование.

*N.A. Bisko, N.O. Koziko, I.V. Sakhanda*

## **Effect of sources of nitrogen and carbon supply on the growth and antioxidant activity of *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. strains**

**Bogomolets National Medical University**

**Introduction.** Search for new natural sources of biologically active compounds in order to obtain effective and safe drugs is one of the important objectives of modern mycology and biotechnology. Among the drugs considerable attention is paid to biotechnologically derived pharmaceuticals based on the mushroom biomass and macromycetes, especially Basidiomycota, are more often used as producers.

**Purpose.** Study of the influence of carbon source and nitrogen supply on the growth and antioxidant activity of *Hericium erinaceus* strains.

**Materials and methods.** 3 strains of *Hericium erinaceus* from the collection of mushroom cultures of Mycology Department of the Institute of Botany (Kyiv) were used as the main object of study. Pure net filamentous cultures were obtained from wild fruiting bodies collected in Israel (Haifa), Japan and China.

**Results.** The results of the study of growth, morphological characteristics and antioxidant activity of valuable medicinal species of *Hericium erinaceus* are offered. Biotechnological use of *H. Erinaceus*, as a potential producer of substances with different biological properties, became possible with the introduction of it in a pure culture. However, the information on features of growth and development in the pure culture is not always complete and sometimes contradictory. Therefore, there is a need for further detailed study of the main morphological and cultural features of *H. erinaceus* when grown under different culture conditions. For all the studied cultures, – 26°C turned out to be the most favorable incubation temperature for the growth, the critical temperature was 36°C. pH ranged within 6.0-6.5.

**Conclusions.** Sources of carbon and nitrogen supply were found to influence the growth and antioxidant activity of the strains. We established that 991 and 965 strains accumulated the greatest biomass quantity when cultured with addition of carbon source (glucose), and 1606 strain – nitrogen source (sodium nitrate).

**Key words:** *Hericium erinaceus*, antioxidant activity, sources of nitrogen and carbon nutrition, growth, cultivation.

### **Відомості про авторів:**

**Бісько Ніна Анатоліївна** - д. б. н., с. н. с., кафедра аптечної та промислової технології ліків Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НМУ імені О.О. Богомольця. Адреса: Київ, вул. Пушкінська, 22, тел.: (044) 235-90-66.

**Козіко Наталія Олександрівна** - к. фарм. н., асистент кафедри аптечної та промислової технології ліків НМУ імені О.О. Богомольця. Адреса: Київ, вул. Пушкінська, 22, тел.: (044) 235-90-66.

**Саханда Іванна Василівна** – ст. лаборант кафедри аптечної та промислової технології ліків НМУ імені О.О. Богомольця. Адреса: Київ, вул. Пушкінська, 22, тел.: (044) 235-90-66.